

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Juni 2001 (21.06.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/43777 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 47/48,
C12N 15/87, 9/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/12413

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. Dezember 2000 (08.12.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 60 206.9 14. Dezember 1999 (14.12.1999) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: AIGNER, Achim [DE/DE]; Hinterwald-
weg 45, 63069 Offenbach (DE). CZUBAYKO, Frank
[DE/DE]; Pfarracker 9, 35043 Marburg (DE). KISSEL,
Thomas [DE/DE]; Im Steiner 9, 79219 Staufen (DE).
FISCHER, Dagmar [DE/DE]; Schuhmarkt 2, 35037
Marburg (DE).

(74) Anwalt: SCHMIDT, Werner; LTS Lohmann Therapie-
Systeme AG, Postfach 1525, 56605 Andernach (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AL, AM, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD,
GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ,
PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eu-
ropäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: COMPLEXATION OF RNA, ESPECIALLY RIBOZYMES, WITH POLYETHYLENIMINES FOR THE STABILIZA-
TION AND CELLULAR INTRODUCTION THEREOF

(54) Bezeichnung: KOMPLEXIERUNG VON RNS, INSBESONDERE VON RIBOZYMEN, MIT POLYETHYLENIMINEN ZU
DEREN STABILISIERUNG UND ZELLULÄREN EINSCHLEUSUNG

(57) Abstract: The invention relates to the complexation of RNA with optionally modified polyethylenimines for extracellular and intracellular *in vitro* and *in vivo* stabilization thereof and for cellular introduction of the complexed RNA in cells. The invention also relates to chemically modified or non-modified, natural or synthetic ribozymes complexes and polyethylenimine (PEI) having any chain length, molar mass and degree of branching, which is chemically modified or non-chemically modified. The invention further relates to the production of complexes and to the use thereof in the protection of RNA against enzymatic and non-enzymatic degradation and their reception *in vitro* or *in vivo* in cells. The biological activity of the ribozymes remains intact.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Komplexierung von RNS mit gegebenenfalls modifizierten Polyethylenimininen zu deren Stabilisierung *in vitro* und *in vivo*, extrazellulär oder intrazellulär, sowie zur zellulären Einbringung der komplexierten RNS in Zellen. Die Erfindung betrifft weiterhin Komplexe aus Ribozymen, chemisch modifiziert oder nicht modifiziert, natürlich oder synthetisch, und Polyethylenimin (PEI) mit beliebiger Kettenlänge, Molmasse und Verzweigungsgrad, chemisch modifiziert oder nicht modifiziert. Die Erfindung umfasst schliesslich Verfahren zur Herstellung der Komplexe und deren Verwendung zum Schutz von RNS gegen enzymatischen und nicht-enzymatischen Abbau und deren Aufnahme in Zellen *in vitro* oder *in vivo*. Bei der Verwendung von Ribozymen bleibt hierbei die biologische Aktivität vollständig.

WO 01/43777 A1

Komplexierung von RNS, insbesondere von Ribozymen, mit Polyethylenimininen zur deren Stabilisierung und zellulären Einschleusung

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft die extra- und intrazelluläre Stabilisierung von modifizierten oder nicht-modifizierten RNS-Molekülen, insbesondere von Ribozymen, gegen enzymatischen und nicht-enzymatischen Abbau durch Komplexierung mit auf Polyethylenimin (PEI) basierenden Makromolekülen sowie die Einschleusung dieser

10 Komplexe in Zellen unter nachfolgender Freisetzung biologisch aktiver RNS-Moleküle.

Aus WO-A-96/02655 sind Komplexe von Desoxyribonukleinsäuren (DNS) mit Polyethylenimininen mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 50 kDa bzw.

15 800 kDa und deren Verwendung in der Gentherapie beschrieben.

In WO-A-98/59064 werden Komplexe von DNS mit modifizierten Polyethylenimininen mit einem mittleren Molekulargewicht von 800 kDa und deren Verwendung für den Gentransfer in Säugerzellen beschrieben.

20

In M.A.Reynolds (Exogenous Delivery of Ribozymes, in: Scanlon, K.J. und Kashani-Sabet, M. (eds.) *Ribozymes in the Gene Therapy of Cancer*, pp. 41-60. R.G. Landes Company, 1998) wird auf die nicht publizierte Beobachtung hingewiesen, dass unter Verwendung nicht näher beschriebener Fluoreszenzfarbstoff-markierter Ribozyme in

25 der Zellkultur mit einem nicht näher beschriebenen PEI eine mehr als 70%ige nukleäre Fluoreszenzmarkierung von Zellen erzielt werden konnte.

Ribonukleinsäure üben in der Zelle vielfältige Funktionen aus und werden entsprechend u.a. als messenger RNS (mRNS), transfer RNS (tRNS), ribosomale

30 RNS (rRNS) bezeichnet .

Von besonderer biomedizinischer Bedeutung sind bestimmte spezialisierte RNS-Moleküle, die sogenannten Ribozyme. Ribozyme sind katalytisch aktive, kleine RNS-Moleküle, die in der Lage sind, andere, für essentielle Zellfunktionen bedeutsame

RNS-Moleküle sequenzspezifisch zu spalten. Es kommt damit zur Herunterregulation der Expression des jeweiligen Gens, d.h. zur Hemmung spezifischer Genfunktionen. Entsprechend ihrer Struktur, Funktion, Aktivität und Grösse lassen sich verschiedene Ribozyme bzw. Ribozymklassen unterscheiden (vgl.Tab.1). Evtl. assoziierte

- 5 Proteinkomponenten dienen dabei der Stabilisierung und Effizienzerhöhung und sind nicht der eigentliche Träger der katalytischen Aktivität.

Ribozyme	Aktivität	Funktion	Größe
Hammerhead-Motiv	Ribonuklease (5'OH)	Replikation	≈ 35 Nukleotide
Hairpin-Motiv	Ribonuklease (5'OH)	Replikation	≈ 60 Nukleotide
HDV Ribozym	Ribonuklease (5'OH)	Replikation	≈ 80 Nukleotide
RNase P	Ribonuklease (5'P)	pre-tRNA Spaltung	> 275 Nukleotide
Intron Gruppe 1	Umesterung	Spleißen	> 200 Nukleotide
Intron Gruppe 2	Umesterung	Spleißen	> 600 Nukleotide

- 10 Tab. 1: Zusammenfassung der verschiedenen Ribozyme mit ihrer Aktivität, Funktion und Größe.

Ribonuklease (5'OH) steht für eine Ribonukleaseaktivität, die ein 5'-OH und einen 2'-3'-zyklischen Phosphatrest erzeugt, Ribonuklease (5'P) steht für eine Reaktion, bei der ein 5'-Phosphat und ein 3'-OH-Ende entsteht.

15

Die Hammerhead-Ribozyme gehören zu den kleinsten und am besten erforschten katalytischen RNS-Molekülen und sind in der Lage, andere RNS-Moleküle sequenzspezifisch zu spalten. Das am häufigsten benutzte Hammerhead-Ribozym ist von dem Original-Ribozym nach Haseloff-Gerlach abgeleitet (Nature **334**, 585-59

(1988)), das modifiziert und auf ein 22 Nukleotide umfassendes katalytisches Zentrum reduziert wurde. Diese Kernsequenz, dessen dreidimensionale und katalytisch aktive Struktur durch Watson-Crick-Basenpaarung entsteht, wird von zwei Armen flankiert, die ebenfalls aufgrund einer Watson-Crick-Basenpaarung spezifisch an den komplementären Sequenzabschnitt der Ziel-RNS hybridisieren und somit den katalytisch aktiven Bereich des Ribozyms in hinreichende räumliche Nähe zu der Spaltstelle der Ziel-RNS bringen. Durch spezifische Spaltung mit anschließendem zellulären Abbau von RNS-Molekülen bestimmter Gene können Ribozyme so u.a. zur diagnostischen und therapeutischen Hemmung spezifischer Genfunktionen genutzt werden.

Die größten Hindernisse, die bislang für den Einsatz von Ribozymen überwunden werden müssen, sind die sehr hohe Anfälligkeit der Moleküle gegenüber dem enzymatischen Abbau durch ubiquitär präsente intra- und extrazelluläre RNS-abbauende Enzyme (Ribonukleasen, RNasen) sowie die schlechte Penetration der Ribozyme in Zellen.

Während intrazellulär produzierte, natürliche RNS-Moleküle (z.B. mRNA und tRNA) in der intakten Zelle durch strukturspezifische Eigenschaften und zelluläre Modifikationen unter bestimmten Bedingungen zumindest über eine begrenzte Stabilität verfügen, lassen sich synthetische RNS-Moleküle wie Ribozyme nur durch chemische Modifikationen gegen diesen schnellen Abbau schützen. Diese chemischen Modifikationen sind jedoch mit wesentlichen Nachteilen behaftet:

- Funktionseinschränkung bis hin zum vollständigen Verlust der Aktivität des Ribozyms
- Entstehung von modifizierten Ribozymen mit ungünstigen, insbesondere zelltoxischen Eigenschaften
- Sehr hoher Aufwand zur Entwicklung dieser chemischen Modifikationen und deren chemischer Umsetzung

Trotzdem sind aufgrund der potentiell überragenden therapeutischen Bedeutung von Ribozymen zahlreiche Anstrengungen zur Stabilisierung durch chemische Modifikationen unternommen worden (z.B. Heidenreich et al., J. Biol. Chem. 269,

2131-2138 (1994); Pieken et al., Science **253**, 314-317 (1991)). Allerdings gilt auch hier, dass diese Modifikationen erstens meist zur Inaktivierung des Ribozyms führen, und zweitens eine sehr aufwendige und teure Synthese erfordern.

5 Zusammenfassend kann man sagen, dass ein effektives Verfahren, welches

- RNS-Moleküle vor Degradation schützt, jedoch
- die Struktur der Moleküle möglichst wenig verändert, sowie
- deren Funktion möglichst nicht beeinflusst,

10

von großem grundlagen- und anwendungsorientiertem wissenschaftlichem und wirtschaftlichem Interesse ist.

In der vorliegenden Erfindung wird beschrieben, dass RNS-Moleküle, insbesondere

15 Ribozyme, durch Komplexierung mit auf Polyethylenimin (PEI) basierenden

Makromolekülen extra- und intrazellulär vor enzymatischem und nicht-enzymatischem Abbau geschützt werden können. Sogar Ribozyme, die sonst einer besonders raschen Degradation unterliegen, werden dabei vollständig vor Abbau geschützt, ohne dass ein Aktivitätsverlust eintritt. Die PEI-Ribozym-Komplexe sind

20 selbst in biologischen, serumhaltigen Medien stabil. Weiterhin entsteht ein Komplex

mit geringer Toxizität, der in der Lage ist, Ribozyme sehr effizient in funktionell aktiver Form in lebende Zellen einzuschleusen und somit zelluläre Prozesse in der gewünschten Form zu manipulieren. Über Ribozyme hinausgehend gestattet die Komplexierung von RNS schließlich eine viel weitergehende, vielfältige Verwendung

25 zur Stabilisierung verschiedenster RNS-Moleküle.

So ist die Methode zusammenfassend dargestellt geeignet

- zur Stabilisierung von RNS-Molekülen, insbesondere Ribozymen, vor enzymatischem oder nicht-enzymatischem Abbau *in vitro* und *in vivo*, extrazellulär oder intrazellulär.
- zur Stabilisierung bei der Lagerung von RNS-Molekülen, insbesondere Ribozymen.

30

- zur Stabilisierung beim Transport von RNS-Molekülen, insbesondere Ribozymen.
 - zur Stabilisierung von RNS-Molekülen, insbesondere von Ribozymen, bei deren Einsatz in Laborexperimenten
 - 5 • als Vektor für RNS-Moleküle, insbesondere für Ribozyme in Gentransferanwendungen in vivo (Gentherapie)
 - als Vektor für RNS-Moleküle, insbesondere für Ribozyme, zur Anwendung in Zellkultur-Experimenten
- 10 Die Erfindung betrifft daher Komplexe aus RNS, insbesondere Ribozymen, und Polyethylenimin (PEI), in welchen das PEI ein Molekulargewicht von 700 bis 1.000.000 Dalton (Da), vorzugsweise 1.400 bis 25.000 Da, insbesondere 1.600 bis 15.000 Da aufweist. Bevorzugt sind erfindungsgemäße Komplexe, in welchen das molare Verhältnis der Stickstoffatome im PEI zu den Phosphoraten in der RNS
- 15 (N/P-Wert) 1 bis 100, vorzugsweise 2 bis 40, insbesondere 3 bis 10 beträgt.

In den erfindungsgemäßen Komplexen kann PEI durch zelluläre Liganden modifiziert sein. Diese Modifikation kann vor oder nach der Komplexbildung der RNS erfolgen. Ebenso kann eine Modifikation durch hydrophilen Polymere wie z.B.

- 20 Polyethylenglykol (PEG) mit einem Molekulargewicht von 100 bis 10.000.000 g/mol, vorzugsweise von 1.000 bis 100.000 g/mol und insbesondere von 5.000 bis 50.000 g/mol erfolgen. Dabei kann ein PEI durch ein oder mehrere hydrophile Polymere oder ein hydrophiles Polymere durch ein oder mehrere PEIs modifiziert sein. Solche modifizierten PEIs und Verfahren zu ihrer Herstellung sind beschrieben in der
- 25 internationalen Anmeldung PCT/EP00/06214; durch Bezugnahme darauf wird ihr Inhalt zum Bestandteil der Offenbarung der vorliegenden Anmeldung.

- Die zu schützende RNS kann jede beliebige RNS, insbesondere eine messenger-RNS (mRNS), eine ribosomale RNS (rRNS), eine transfer-RNS (tRNS), eine Kern-
- 30 RNS (nukleäre RNS), ein RNS-Ribozym, eine in vitro transkribierte RNS oder eine chemisch synthetisierte RNS sein, wobei alle genannten RNS-Moleküle chemisch modifiziert sein können. Dabei kann die RNS 10 bis 10.000 Nukleotide, vorzugsweise 15 bis 1.500 Nukleotide, insbesondere 20 bis 1.000 Nukleotide aufweisen. Im Falle

von Ribozymen sind Kettenlängen von 20 – 600 Nukleotiden, insbesondere von 35 – 80 Nukleotiden, bevorzugt.

Bevorzugt sind Komplexe, in welchen die RNS ein Ribozym, insbesondere ein

- 5 Hammerhead- oder ein Hairpin-Ribozym, ist oder bei der es sich um RNS-Aptamere oder Antisense-Sequenzen handelt. Bevorzugt sind ferner Komplexe, in welchen die RNS ganz oder zum Teil für ein therapeutisch wirksames Peptid oder Protein oder aber für ein zelluläres Selbstmordgen kodiert.

- 10 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Komplexes, bei welchem die RNS mit dem gegebenenfalls durch zelluläre Liganden oder durch weitere Polymere modifiziertem PEI durch Mischen der verdünnten Lösungen komplexiert wird.

- 15 Die Herstellung der erfindungsgemäßen Komplexe wird technisch wie folgt durchgeführt:

Für die Komplexierung von RNS, insbesondere von Ribozymen, mit PEI wird eine wässrige Lösung der RNS hergestellt. Die RNS kann chemisch modifiziert oder nicht

20 modifiziert sein. Erfindungsgemäße Verfahren sind bevorzugt, bei welchen die RNS-Konzentration vorzugsweise 0,1 – 100 µg/ml, insbesondere 10 – 40 µg/ml beträgt.

Als Komplexierungsreagenzien sind käufliche Präparate modifizierten oder nicht modifizierten PEIs geeignet, sowie nicht käufliche modifizierten oder nicht

- 25 modifizierte PEIs wie z.B. LMW-PEI (Fischer et al. Pharm. Res. 16, 1273-9 (1999)).

Zur Herstellung der jeweiligen Stammlösung wird das betreffende PEI in bidestilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit etwa 100 mM HCl-Lösung auf einen neutralen pH-Wert vorzugsweise zwischen 7 und 8, besonders bevorzugt auf pH 7,4, eingestellt.

30

Unmittelbar vor der Durchführung der Komplexierungsreaktion wird die PEI-Stammlösung (bezüglich der eingesetzten Menge siehe untenstehende Tab. 2 u. 3) mit einer wässrigen etwa 150 mM neutralen NaCl-Lösung, pH 7 bis 8, vorzugsweise

7,4, auf das gewünschte Volumen eingestellt und einige Zeit, vorzugsweise mindestens 10 min bei RT inkubiert.

Die RNS (bezüglich der eingesetzten Menge siehe beispielsweise untenstehende

- 5 Tab. 2 u. 3) wird mit einer wässrigen etwa 150 mM NaCl-Lösung, pH 7 bis 8, vorzugsweise 7,4, auf das gewünschte Volumen, besonders bevorzugt das etwa gleiche Volumen wie das der PEI-Lösung, gebracht und einige Zeit, vorzugsweise mindestens 10 min bei RT inkubiert.
- 10 Anschließend werden die PEI- und die RNS-Lösungen (Mischverhältnisse siehe beispielsweise untenstehende Tab. 2 u. 3) gemischt und einige Zeit, vorzugsweise mindestens 10 min bei RT inkubiert. Die Mischung kann dabei einmal oder mehrmals geschüttelt oder gevortext werden.
- 15 Die Komplexzusammensetzung und die Nettoladung werden auf der Basis von RNS-Phosphor zu PEI-Stickstoff berechnet und als Stickstoff-Phosphor-Verhältnis (N/P-Verhältnis, s.o.) nach Boussif et. al. (Proc. Natl. Acad. Sci. **92**, 7297-7301 (1995)) bzw. Phosphor-Stickstoff-Verhältnis angegeben.
- 20 Als Berechnungsgrundlage dient folgende Formel:
- | | | | |
|---------------|---|--------------------|-------|
| 1 µg RNS | = | 3 nmol Phosphor | sowie |
| 1 µl PEI-Lsg. | = | 10 nmol Stickstoff | |
- 25 Die Ansatzverhältnisse eines Standardansatzes mit 2 µg RNS und den entsprechenden Mengen PEI werden in den folgenden Tabellen am Beispiel von zwei PEI-Präparaten zusammengefasst (siehe aber auch weitergehende Ausführungen unten):

Ansatzverhältnisse RNS/HMW-PEI (Äquivalente)	Volumen HMW-PEI-Stammlösung 0,9mg/ml [μ l]	HMW-PEI absolut [μ g]
1 + 1	6 (1:10 verdünnt)	0,27
1 + 6,67	4	2,7
1 + 10	6	1,8
1 + 13,33	8	3,6
1 + 20	12	5,4

Tab. 2: Übersicht über verwendbare HMW-PEI-Ansatzverhältnisse.

Ansatzverhältnisse RNS/LMW-PEI (Äquivalente)	Volumen LMW-PEI-Stammlösung 0,9mg/ml [μ l]	LMW-PEI absolut [μ g]
1 + 1	6 (1:10 verdünnt)	0,54
1 + 2	12 (1:10 verdünnt)	1,08
1 + 13,33	8	7,2
1 + 20	12	10,8
1 + 26,67	16	14,4
1 + 40	24	21,6
1 + 66,66	40	36
1 + 100	60	54

5

Tab. 3: Übersicht über verwendbare LMW-PEI-Ansatzverhältnisse.

Nach erfolgter Inkubation sind die Komplexe gebrauchsfertig verwendbar bzw.

10 können in weitere chemische Modifikationen eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft die dargestellten Verfahren zum Schutz von RNS, insbesondere von Ribozymen, gegen enzymatischen und nicht-enzymatischen Abbau, bei welchen die RNS-Moleküle im Komplex mit modifiziertem oder nicht-modifiziertem

PEI stabilisiert werden, sowie Verfahren bei welchen RNS-Ribozyme vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind Verfahren zur Einschleusung von RNS, insbesondere Ribozyme, in Zellen, vorzugsweise in eukaryontische Zellen, und deren intrazelluläre Freisetzung in biologisch aktiver Form.

Die Erfindung betrifft ferner Zusammensetzungen, welche eine wirksame Menge mindestens eines erfindungsgemäßen RNS-PEI-Komplexes enthält, wobei die RNS in jeder für Zellen oder für den jeweiligen Organismus subtoxischen oder zumindest bei mehrstündiger Behandlung noch nicht dauerhaft zellschädigender Konzentration vorliegen kann.

Die Erfindung betrifft außerdem pharmazeutische Zusammensetzungen enthaltend eine wirksame Menge mindestens eines erfindungsgemäßen RNS-PEI-Komplexes und einen oder mehrere physiologisch unbedenkliche Träger.

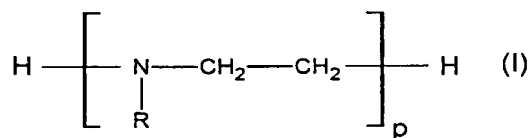
Das RNS/PEI-Verhältnis lässt sich über das molare Verhältnis der Stickstoffatome im PEI zu den Phosphoraten in der RNS angeben (N/P-Wert). Der N/P-Wert darf für eine vollständige Komplexierung der RNS nicht zu niedrig sein.

Vor allem nach oben kann der N/P-Wert der Komplexe aber über einen breiten Bereich schwanken, er kann im Bereich von etwa 1 bis etwa 100 gelegen sein. Bevorzugt beträgt das Verhältnis etwa 2 bis etwa 40, besonders bevorzugt beträgt das Verhältnis 3 bis 10.

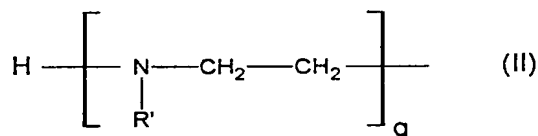
Für den speziellen Anwendungsfall, z.B. für den jeweiligen RNS-Typ, insbesondere für Ribozyme, für PEI bestimmter Molmassen oder für den jeweiligen Zelltyp, können optimale N/P-Werte durch Vorversuche ermittelt werden. Bei schrittweiser Erhöhung des Verhältnisses unter ansonsten identischen Bedingungen sind dabei der Umfang des Schutzes der RNS, insbesondere des Ribozyms, die Effizienz des RNS-, insbesondere des Ribozym-Transfers, die intrazelluläre Aktivität des Ribozyms und das Ausschließen toxischer Wirkungen des Komplexes oder einzelner Bestandteile die wichtigsten Parameter, evtl. auch Materialersparnis oder Zeitkinetiken.

Das hier für die Komplexierung verwendete PEI weist Molekulargewichte zwischen 700 und 1.000.000 Da auf. Über den gesamten Molekulargewichtsbereich sowie unabhängig vom Verzweigungsgrad sind alle PEI-Moleküle, modifiziert oder nicht
 5 modifiziert, zum Schutz von RNS-Molekülen, insbesondere von Ribozymen, geeignet, weisen aber Unterschiede bezüglich der zellulären Aufnahme der Komplexe auf. Große PEI-Moleküle zeigen bereits bei niedrigen N/P-Verhältnissen eine optimale Effizienz bei der zellulären Aufnahme, sind aber toxischer als kleine PEI-Moleküle. Letztere erfordern bei gleicher RNS-Menge, insbesondere Ribozym-
 10 Menge, zur Komplexierung ein höheres N/P-Verhältnis, ohne dabei vergleichbar toxisch zu sein. Welches PEI-Molekül im einzelnen verwendet wird, kann in Vorversuchen ermittelt werden.

Sie lassen sich beispielsweise durch die Strukturformel I beschreiben,



worin R ein Rest der Formel II ist,



in welchem R' Wasserstoff bedeutet. p ist eine positive ganze Zahl, q ist 0 oder eine positive ganze Zahl und (p+ q) ist 15 – 25.000, vorzugsweise 30 – 600, insbesondere 35 – 400. Darüber hinaus kann II auch verzweigt sein. Dann ist R' ein Rest eines PEI, der analog wie Formel II aufgebaut ist.

Bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind PEI-Moleküle im Molekulargewichtsbereich zwischen 1.400 und 25.000.

Hierzu ist LMW-PEI („low molecular weight PEI“) geeignet, das aus Aziridin (Ethylenimin-Monomer) durch ringöffnende Polymerisation in wässriger Lösung unter Säurekatalyse hergestellt wird. Die Synthese wird in Fischer et al., Pharm. Res. 16, 1273-9 (1999) beschrieben.

5

Daneben können kommerziell erhältliche PEI-Präparationen mit unterschiedlichen Molekulargewichten eingesetzt werden. Beispiele sind PEI 700 Da, PEI 2000 Da und PEI 25000 Da (Aldrich), sowie, von der Firma BASF unter dem Markennamen Lupasol® angeboten, 800 Da (Lupasol® FG), 1300 Da (Lupasol® G 20 wasserfrei),
10 1300 Da (Lupasol® G 20), 2000 Da (Lupasol® G 35) und 25000 Da (Lupasol® WF).

Das PEI kann durch einen zellulären Liganden, im folgenden mit „Q“ bezeichnet, modifiziert sein. Unter einem zellulären Liganden versteht man eine Gruppe, die eine spezifische oder unspezifische biologische Funktion ausübt, insbesondere einen
15 Bindungspartner darstellt für Wechselwirkungen mit Rezeptoren oder anderen zellulären Proteinen. Die Modifikation mit einem Liganden dient insbesondere der Zielzell-spezifischen Aufnahme eines RNS-PEI-Q-Komplexes in höhere eukaryontische Zellen und deren Zellkern, wobei die RNS vorzugsweise ein Ribozym (Gentargeting) ist.

20

Q kann somit auch ein Ligand für eine spezifische Wechselwirkung und für die bevorzugte Aufnahme der RNS-PEI-Q-Komplexe in Zielzellen, -gewebe oder -organe sein. Beispiele für Q sind Proteine, insbesondere

- 25
- Antikörper oder Antikörperfragmente wie Fab, F(ab₂), scFv, oder
 - Cyto- oder Lymphokine, wie Interleukine (IL-2 bis X), Interferon GM-CSF, oder
 - Wachstumsfaktoren, wie EGF, PDGF, FGF, EPO, oder
 - Integrine wie ICAM, VCAM, oder
 - Glykoproteine wie Lektine oder glykosylierte Proteine (s.o.), oder

30

 - Lipoproteine wie LDL, HDL, oder
 - Transporterproteine wie Transferrin, oder
 - Peptide wie LH-RH, Calcitonin, Oxytocin, Insulin, Somatostatin, IGF, RGD, oder
 - Kohlenhydrate wie Galactose, Mannose, Glucose, Lactose, oder

- Hormone wie Steroide, THR, oder
- Vitamine wie Vitamin B12, Folsäure.

Für bestimmte *in vivo* Anwendungen ist es im Hinblick auf eine hohe

- 5 Gentransfereffizienz erforderlich, dass die erfindungsgemäßen Komplexe in hoher Konzentration vorliegen. Die erfindungsgemäßen Komplexe weisen den Vorteil auf, dass sie aus verdünnten Lösungen beispielsweise über physikalische Methoden wie Ultrazentrifugation, Ultrafiltration oder Druckdialyse auf die erforderliche hohe Konzentration gebracht werden können, ohne dass eine nennenswerte
- 10 Aggregatbildung oder sonstige Veränderung der Komplexe, die die Gentransfereffizienz beeinträchtigen würde, auftritt.

Insbesondere liegt die Zusammensetzung in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung vor. In dieser Ausgestaltung dient die Zusammensetzung nicht

- 15 nur zum Schutz von RNS, sondern auch zum Transfer der RNS in Zellen, insbesondere eukaryontischen Zellen, besonders bevorzugt Säugetierzellen, *in vivo* oder *in vitro*. Sie enthält als aktiven Bestandteil einen Komplex, der eine therapeutisch wirksame RNS, insbesondere ein Ribozym oder mehrere Ribozyme, enthält. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung
- 20 kann, bei lokaler Anwendung, eine hohe Konzentration an therapeutisch wirksamer RNS in den Zielzellen bzw. bei *in vivo*-Experimenten im Zielgewebe erzielt werden. Bei der systemischen Anwendung hat die Zusammensetzung den Vorteil, dass die Komplexe wegen der Verhinderung der Opsonierung weder unspezifischer Bindung noch Immunsystem-induziertem Abbau unterliegen.

- 25 Durch Verhinderung bzw. Verringerung von unspezifischen Bindungen bei gleichzeitigem Einführen von (zelltypspezifischen) zellbindenden Liganden in die Komplexe kann ein spezifisches Targeting zu bestimmten Zellen, Organen oder Geweben und damit eine zielgerichtete Genexpression (z.B. in Tumorgewebe) oder
- 30 andere Wirkung nach systemischer Verabreichung erzielt werden.

In Geweben mit erhöhter Gefäßpermeabilität bzw. mit Gefäßschädigungen können die erfindungsgemäßen RNS-PEI-Komplexe aus der Blutbahn in die umliegenden Gewebe austreten und dort akkumulieren. Bereiche, wo ein solches „passives

Targeting" verstärkt auftritt, sind z.B. gut durchblutete Tumore sowie Entzündungsbereiche. In manchen dieser Fälle wird dann bereits eine hinreichend hohe Zielselektivität erreicht werden, so dass die Verknüpfung von PEI mit zielzellspezifischen Liganden unterbleiben kann.

5

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann u.a. vorteilhaft für die Therapie von Tumorerkrankungen verwendet werden, um intratumoral oder systemisch RNS, insbesondere Ribozyme, zu verabreichen.

- 10 Eine weitere Anwendung, bei der die Vorteile der erfindungsgemäßen Zusammensetzung zum Tragen kommen, ist die sog. genetische Tumorstimmung. Die dabei benutzten Komplexe enthalten RNS, kodierend für ein oder mehrere Tumorstimmantigene oder Fragmente davon.

- 15 Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung des Komplexes liegt bevorzugt als Lyophilisat vor, gegebenenfalls unter Zusatz von Zucker wie Saccharose oder Dextrose in einer Menge, die in der gebrauchsfertigen Lösung eine physiologische Konzentration ergibt. Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann auch tiefgefroren (kryokonserviert) oder als gekühlte Lösung vorliegen und weitere

- 20 Zusätze enthalten.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können gegebenenfalls in Form eines Kits vorliegen, wobei die Einzelkomponenten RNS, insbesondere Ribozyme, einerseits und PEI, an das gegebenenfalls ein Ligand gekoppelt ist, andererseits in

- 25 getrennten Behältern vorliegen.

Die folgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung, ohne dass diese darauf beschränkt wäre.

30

Beispiel 1:**Schutz von nicht-modifizierten, chemisch synthetisierten RNS-Oligonukleotiden (37 Nukleotide) vor enzymatischem Abbau durch****5 Komplexierung mit PEI.**

Die in der Literatur bisher nicht beschriebene Komplexierung zwischen Hammerhead-Ribozymen und PEI wurde in Bezug auf die Stabilität des Ribozyms gegenüber der Degradation durch Serumnukleasen untersucht. Eine so erzielte

10 Verlängerung der Halbwertszeit in Anwesenheit von Serum würde eine systemische Applikation unmodifizierter Ribozyme ermöglichen, die ihren chemisch modifizierten Analoga in Bezug auf katalytische Aktivität und Herstellungskosten überlegen sind.

Für die Versuche wurden zwei Polyethylenimin-Lösungen mit unterschiedlichem

15 Molekulargewicht verwendet. HMW-PEI wurde als 50%ige wässrige Lösung von der Firma Fluka (Neu-Ulm) mit einem Molekulargewicht von 600-1000 kDa (Herstellerangabe, viskosimetrisch bestimmt) bezogen. Zur Herstellung der Stammlösung wurden 9,0 mg HMW-PEI in 8 ml bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit 0,1 N HCl-Lösung auf 7,4 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf

20 10,0 ml aufgefüllt.

LMW-PEI wurde aus Aziridin (Ethylenimin-Monomer) durch ring-öffnende Polymerisation in wässriger Lösung unter Säurekatalyse hergestellt. Das Molekulargewicht von ≤ 10 kDa wurde mittels Laserstreulichtmessung von der Fa.

25 Wellensieck (Minden) bestimmt (Fischer et al., Pharm. Res. **16**, 1273-9 (1999)). Zur Herstellung der Stammlösung wurden 9,0 mg LMW-PEI in 8 ml bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit 0,1 N HCl-Lösung auf 7,4 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf 10,0 ml aufgefüllt.

30 Bei dem RNS-Oligonukleotid handelt es sich um ein Hammerhead-Ribozym mit einer Länge von 37 Basen, das mit einer 5'-O-DMT-ON-2'-Ofmp-Schutzgruppe versehen war (Fa. MWG- Biotech GmbH, Ebersberg). Für die Stabilitätsuntersuchungen wurde die Schutzgruppe mittels eines mitgelieferten Schutzgruppenentfernungs-Kits (Fa.

Cruachem, Glasgow) durch saure Hydrolyse abgespalten und die entschützte RNS mittels Ethanolfällung gewonnen.

Die Komplexierung der Oligonukleotide mit PEI wurde nach der oben dargestellten

5 Anleitung durchgeführt.

Es wurden für HMW-PEI fünf, für LMW-PEI sieben verschiedene Oligonukleotid-PEI-Verhältnisse gewählt. Die Auswahl erfolgte in Anlehnung an

Komplexierungsversuche zwischen HMW- und LMW-PEI und dem cMV-nlacZ-

10 Plasmid (Fischer, Nichtvirale Vektoren zur Gentherapie: Kationische Polymere als Vektorsysteme für den Transfer von DNA. Cuvillier Verlag, Göttingen, 1. Auflage (1998)).

Die Ansatzverhältnisse eines Standardansatzes mit 2 µg Oligo und den damit

15 umgesetzten Mengen PEI werden in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

Ansatzverhältnisse RNS/HMW-PEI (N/P-Ratio)	Volumen HMW-PEI-Stammlösung 0,9mg/ml [µl]	HMW-PEI absolut [µg]
1 + 1	6 (1:10 verdünnt)	0,27
1 + 6,67	4	2,7
1 + 10	6	1,8
1 + 13,33	8	3,6
1 + 20	12	5,4

Tab.4: Übersicht über die verwendeten HMW-PEI-Ansatzverhältnisse.

Ansatzverhältnisse RNS/LMW-PEI (N/P-Ratio)	Volumen LMW-PEI-Stammlösung 0,9mg/ml [μ l]	LMW-PEI absolut [μ g]
1 + 1	6 (1:10 verdünnt)	0,54
1 + 2	12 (1:10 verdünnt)	1,08
1 + 13,33	8	7,2
1 + 20	12	10,8
1 + 26,67	16	14,4
1 + 40	24	21,6
1 + 66,66	40	36

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten LMW-PEI-Ansatzverhältnisse.

5 Inkubation von Ribozym-PEI-Komplexen mit fötalem Kälberserum (FKS)

Zur ersten Orientierung, ob PEI Ribozyme gegen den Abbau durch Serumnukleasen schützt, wurden die Komplexe HMW-PEI 1+ 13,3 und LMW-PEI 1+ 66,6 gewählt und über 5 und 15 min bei 37°C in 100 % FKS inkubiert. Die Auswahl dieser beiden

- 10 Komplexe erfolgte aufgrund der beschriebenen hohen Transfektionsraten von Plasmid-Komplexen im Vergleich zu den anderen HMW- und LMW-PEI-Komplexen) (Fischer et al., Pharm. Res. **16**, 1273-9 (1999)). Nach erfolgter Inkubation wurden die Serumproteine mittels Hitzeinaktivierung denaturiert, indem die Ansätze für 30 min in einem Wasserbad bei 70°C inkubiert wurden. Durch Zusatz von 8 μ l 10%iger SDS-
- 15 Lösung wurden noch aktive Enzyme zerstört und gleichzeitig die Ribozyme aus den Komplexen mit PEI freigesetzt. Die Mischung wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt, und intakte RNS-Banden wurden mittels eines fluoreszierenden Cyanin-Farbstoffs (SYBR-Gold®, Fa. MoBiTech, Göttingen), der an einzel- oder doppelsträngige DNS oder RNS bindet, detektiert.

20

Im Gegensatz zu den nicht-komplexierten Ribozymen, die bereits nach 5 min vollständig degradiert waren, wurden die mit HMW-PEI oder LMW-PEI komplexierten

Ribozyme über 15 min Inkubationsdauer fast vollständig vor dem Abbau durch die im Serum enthaltenen Nukleasen geschützt.

- Es wurden nun HMW-PEI und LMW-PEI-Komplexe in den zuvor untersuchten
- 5 Stickstoff-Phosphat-Verhältnissen hergestellt und für 15 - 120 min in 10 % Serum analog zum vorhergehenden Versuch inkubiert. Zur Kontrolle der Versuchsergebnisse wurden neben den nicht-komplexierten Ribozymen auch Ribozyme in den Komplexen HMW-PEI (1+1) und LMW-PEI (1+2) mit aufgetragen, in denen wie aus Vorversuchen bekannt keine vollständige Komplexierung eintritt und
- 10 die folglich keinen Schutz der RNS vor Degradation bieten sollten. Sowohl die nicht-komplexierten Ribozyme als auch die RNS-Oligonukleotide, die in zu niedrigen Stickstoff-Phosphat-Verhältnissen mit PEI komplexiert wurden, waren erwartungsgemäß sowohl nach 60 min als auch nach 120 min durch die Serumnukleasen vollständig degradiert. Die anderen beiden Komplexe (HMW-PEI 1+
- 15 13,3 und LMW-PEI 1+ 66,6), die aufgrund einer vollständigen Komplexierung des Ribozyms durch PEI eine Schutzwirkung gegen den enzymatischen Abbau über einen Zeitraum von 30 min bereits gezeigt hatten, stabilisierten das Ribozym auch über 60 min und 120 min.
- 20 Abschließend kann somit festgehalten werden, dass HMW-PEI und LMW-PEI in der Lage sind, komplexierte RNS-Ribozyme ab Stickstoff-Phosphat-Verhältnissen von 1+6,67 (HMW-PEI) und 1+13,3 (LMW-PEI) gegen Degradation durch Serumnukleasen über einen Zeitraum von mindestens 120 min zu schützen. Diese Verlängerung der Halbwertszeit von wenigen Minuten auf mehr als zwei Stunden
- 25 macht es möglich, nicht-modifizierte RNS-Ribozyme sowohl für *in-vitro* als auch *in-vivo* Transfektionsexperimente zu verwenden.

Beispiel 2:

Schutz von nicht-modifizierten, in-vitro transkribierten RNS-Molekülen (300 - 800 Nukleotide) vor enzymatischem Abbau durch Komplexierung mit PEI.

5

Wie in Beispiel 1 gezeigt, konnten kürzere RNS-Moleküle, die in ihrer Länge Hammerhead-Ribozymen oder tRNS-Molekülen entsprechen, durch PEI-Komplexierung stabilisiert werden. In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob auch längere RNS-Moleküle (bis zu 1000 Nukleotide), die mRNS-Molekülen entsprechen, in gleicher Weise geschützt werden. Da so lange RNS-Moleküle chemisch nicht synthetisiert werden können, wurde hier die Methode der *in-vitro* Transkription benutzt (in-vitro Transkriptionskit der Firma Promega). Hierbei wird ein DNS-Template (Plasmid-DNS) mittels RNS-Polymerase *in vitro* in RNS umgeschrieben. Diese RNS ähnelt in ihrer Länge und Struktur zellulärer mRNS, obwohl wichtige stabilisierende Elemente, wie die 5'-Cap Struktur und der 3'-poly-A-Tail fehlen. Somit ist *in vitro* transkribierte RNS empfindlicher gegen den Abbau durch Ribonukleasen als natürliche zelluläre mRNS. Zur besseren Darstellung und Quantifizierung wurde die RNS durch den Einbau ³²P-markierter Nukleotide radioaktiv markiert. Für die Versuche wurden zwei verschiedene RNS-Moleküle hergestellt, die 300 bzw. 800 Nukleotide lang waren.

10
15
20

Die radioaktiv markierten RNS-Moleküle wurden, komplexiert mit LMW-PEI vs. nicht-komplexiert, entweder mit rekombinanter RNase A (Endkonzentration 20 ng/ml) oder fötalem Kälberserum (1% - 40 % Endkonzentration) für verschiedene Zeitintervalle (0 - 120 Minuten) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die RNS auf einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, und die RNS wurde anschließend mittels der Northern-blotting Technik auf eine RNS-bindende Nylonmembran transferiert. Zur qualitativen Auswertung wurden auf der getrockneten Membran Röntgenfilme für 2 - 8 d, zum Teil unter Verwendung eines Verstärkungssystems (BioMax), exponiert. Zur Quantifizierung wurden die radioaktiven Signale auf den Nylonmembranen über einen Phosphorimager der Firma Molecular Dynamics erfasst und mittels einer Analysesoftware derselben Firma ausgewertet.

25
30

Die Ergebnisse sind in Fig. 1 zusammengefaßt. Während nach der Inkubation mit RNase A (Endkonzentration 20 ng/ml) die nicht-komplexierte RNS erwartungsgemäß bereits nach 15 Minuten fast komplett abgebaut ist, sind von der PEI-komplexierten RNS auch nach 2 Stunden Inkubation noch mehr als 60 % der Moleküle intakt. Eine sehr ähnliche Kinetik ergibt sich auch nach der Inkubation mit fötalem Kälberserum (Fig. 2). Hier ist die nicht-komplexierte RNS nach ca. 30 Minuten nach der Inkubation mit 1 % fötalem Kälberserum komplett abgebaut, während die PEI-komplexierte RNS auch nach 120 Minuten noch vollständig intakt ist. Auch bei Erhöhung der Konzentration auf 40 % fötales Kälberserum ist die PEI-komplexierte RNS gegenüber der nicht-komplexierten RNS deutlich stabiler. Die Ergebnisse waren identisch für die verschieden langen RNS-Moleküle. Die Daten der Graphiken wurden aus zwei unabhängigen Experimenten gemittelt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in vitro transkribierte RNS-Moleküle (300-800 Nukleotide lang) unkomplexiert erwartungsgemäß innerhalb sehr kurzer Zeit von Ribonukleasen abgebaut wurden. Durch Komplexierung mit niedermolekularem PEI (LMW-PEI) konnte die Halbwertszeit der RNS in fötalem Kälberserum (bis zu 40 % Endkonzentration) auf über zwei Stunden verlängert werden.

20

Beispiel 3:

Chemisch-synthetisierte, nicht-modifizierte RNS-Ribozyme werden durch Komplexierung mit LMW-PEI in Tumorzellen eingeschleust und spalten ihre Ziel-RNS mit hoher Effizienz.

Nachdem die ersten beiden Beispiele die Stabilisierung von verschiedenen RNS-Molekülen durch LMW-PEI demonstrierten, wurde untersucht, ob mit LMW-PEI komplexierte RNS in die Zellen gelangt und intrazellulär in ihrer biochemischen Funktion unbeeinträchtigt ist.

30

Zu diesem Zweck wurden die unter Beispiel 1 beschriebenen chemisch synthetisierten Hammerhead-Ribozyme verwendet. Diese Ribozyme sind gegen die

humane mRNS eines Fibroblasten-Wachstumsfaktor-bindenden Proteins (FGF-BP) gerichtet (Czubayko et al., Nature Med. 3 (10), 1137-1140 (1997)). Das FGF-BP Protein wird in vielen menschlichen Tumoren und davon abgeleiteten Tumorzelllinien exprimiert. Die Funktionalität der Ribozyme konnte in früheren Experimenten
5 dadurch nachgewiesen werden, dass nach stabiler Transfektion der eukaryontischen Ribozymexpressionsvektoren in Tumorzellen (ME-180 Cervixkarzinomzelllinie, LS174T Kolonkarzinomzelllinie) das Zielgen auf mRNS- und auf Proteinebene deutlich reduziert wurde (Czubayko et al., Nature Med. 3 (10), 1137-1140 (1997)).

10 Während diese Gentransfermethode vollkommen ungeeignet ist, um z.B. solide Tumoren oder Metastasen *in vivo* zu erreichen und zu therapieren, könnten hier LMW-PEI-Ribozym-Komplexe eine hervorragende Alternative bieten. Aus Vordaten anderer Gruppen ist bekannt, dass LMW-PEI sehr effizient mit geringer Toxizität die zelluläre Aufnahme von Desoxyribonukleinsäuren vermittelt.

15 Für die hier beschriebenen Experimente wurden die gegen FGF-BP gerichteten chemisch synthetisierten Ribozyme (1,0 und 0,1 µg; ca. 10 bzw. 1 nmol Endkonzentration) verwendet und mittels LMW-PEI in ME-180 Tumorzellen eingebracht. Die zwei unterschiedlichen Ribozymmengen wurden darüber hinaus in
20 zwei verschiedenen Verhältnissen mit LMW-PEI komplexiert (P/N-Verhältnisse von 1:13 und 1:53). Diese Ribozym-PEI-Komplexe wurden für 4 Stunden in 10 ml serumfreiem IMDM-Medium (Firma PAA) auf ca. 1×10^6 ME-180 Zellen, die als Monolayer auf 10 cm Zellkulturschalen wuchsen, gegeben. Als Kontrolle für unspezifische Effekte wurden ME-180 Zellen mit der gleichen Menge LMW-PEI ohne
25 komplexiertes Ribozym behandelt. Danach wurde das Transfektionsmedium aspiriert und die Zellen wurden wieder auf normales Wachstumsmedium (IMDM plus 10 % FCS) gesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Transfektion (6 - 36 Stunden) wurden die Zellen lysiert und die gesamte zelluläre RNS nach Standardprotokoll (Trizol-Reagenz, Firma Sigma) isoliert. Die so gewonnene RNS
30 wurde mittels Northern-blot analysiert, wobei als Sonde eine mittels ^{32}P radioaktiv markierte FGF-BP cDNA eingesetzt wurde. Die Detektion von FGF-BP mRNS wurde mit Hilfe von Autoradiogrammen und Phosphorimager dargestellt und quantifiziert. Wie aus den Fig. 3 - 5 hervorgeht, führte die Transfektion mit LMW-PEI-Ribozymen zu einer sehr starken Ribozym-spezifischen Abnahme der FGF-BP Genexpression.

Die maximale Reduktion betrug ca. 70 % verglichen mit den Kontrollzellen. Beide Ribozym-PEI-Verhältnisse von 1:13 und 1:53 zeigten ähnliche Effektivität.

- Interessanterweise war die niedrigere Ribozym-Dosis von 0,1 µg in beiden PEI-Verhältnissen etwas wirksamer, so dass man davon ausgehen kann, dass auch noch
- 5 niedrigere Dosen bereits sehr effizient sein können.

- Diese ausgeprägte Inhibition der FGF-BP Genexpression um maximal 70 % nach 24 Stunden ist noch bemerkenswerter, wenn man sie im Kontext von Vergleichsuntersuchungen sieht. Wir haben in transienten Transfektionsstudien mit
- 10 verschiedenen Gentransfervektoren (z.B. Plasmid-DNS, adenovirale Vektoren, verschiedene Lipidvesikel) weder mit Ribozymen noch mit DNS-Oligonukleotiden Hemmungen von mehr als 25 % beobachten können. Insbesondere haben wir mit chemisch stabilisierten RNS/DNS-Ribozym-Hybridmolekülen (werden als Goldstandard gesehen), die uns von der führenden Firma auf diesem Gebiet
- 15 (Ribozyme Pharmaceuticals, Boulder, Colorado, USA) zur Verfügung gestellt wurden, keine Abnahme der Ziel-RNS nachweisen können (unpublizierte Daten).

- Es lässt sich also festhalten, dass diese Kombination aus LMW-PEI und nicht-modifizierten RNS-Ribozymen ein neues und außerordentlich effektives Agens zur
- 20 selektiven Reduktion der Expression von Genen nach Wahl ist.

Beispiel 4:

- 25 **Chemisch-synthetisierte, nicht-modifizierte, mit LMW-PEI komplexierte RNS-Ribozyme führen nach intraperitonealer Applikation in athymischen Nacktmäusen zur spezifischen Hemmung des Wachstums von menschlichen Melanomxenotransplantaten**
- 30 Nachdem in den ersten drei Beispielen die Stabilisierung von verschiedenen RNS-Molekülen durch LMW-PEI sowie die biologische Aktivität von mit LMW-PEI komplexierten Ribozymen in menschlichen Tumorzellen in Zellkulturexperimenten gezeigt wurde, wurde untersucht, ob die systemische Applikation von mit LMW-PEI

komplexierten Ribozymen in athymischen Nacktmäusen das Wachstum menschlicher Tumorzellxenotransplantaten hemmen kann.

Zu diesem Zweck wurden chemisch synthetisierte Hammerhead-Ribozyme, die
5 gegen die humane mRNA eines Heparin-bindenden-Wachstumsfaktors (Pleiotrophin = PTN) gerichtet sind, verwendet (Czubayko et al., PNAS 93, 14753-14758 (1996)).

Das PTN Protein wird in vielen menschlichen Tumoren und davon abgeleiteten Tumorzelllinien exprimiert. Die Funktionalität der Ribozyme gegen PTN konnte in früheren Experimenten dadurch nachgewiesen werden, dass nach stabiler

10 Transfektion der eukaryontischen Ribozymexpressionsvektoren in Tumorzellen (1205 Melanomzelllinie) das Zielgen auf mRNA- und auf Proteinebene deutlich reduziert wurde (Czubayko et al., PNAS 93, 14753-14758 (1996)). Weiterhin war das Wachstum von 1205 Tumorzellxenotransplantaten in athymischen Nacktmäusen in den Ribozym-transfizierten Zelllinien deutlich reduziert. Eine Reduktion der PTN-

15 Proteinmenge um 25 % führte bereits zu einer Hemmung des Tumorstwachstums in Nacktmäusen um ca. 33 %. Diese Vordaten machen dieses Tumormodell besonders geeignet zum Nachweis der Effizienz neuer Gentrargetingmethoden *in vivo*, da aus der Hemmung des Tumorstwachstums direkt auf das Ausmaß der Ribozym-vermittelten Reduktion der PTN-Expression geschlossen werden kann.

20 Während stabile und transiente Plasmid-DNS Gentransfermethoden vollkommen ungeeignet sind, um z.B. solide Tumoren oder Metastasen *in vivo* zu erreichen und zu therapieren, könnten hier LMW-PEI-Ribozym-Komplexe eine hervorragende Alternative bieten.

25 In Vorversuchen in der Zellkultur wurde zuerst festgestellt, dass ein Ribozym / LMW-PEI Verhältnis von 1:66,66 in 1205 Zellen optimale Transfektionsergebnisse ergibt. Für den Tierversuch wurde eine Dosis von 8 µg Ribozym pro Injektion pro Maus festgelegt. Dies ergibt bei einem Gesamtgewicht von 20 g pro Maus eine Ribozym-
30 Dosis von 0,4 mg/kg Körpergewicht. Diese Dosis sollte alle zwei Tage über drei Wochen den Versuchstieren intraperitoneal (i.p.) appliziert werden. Die Ribozym / LMW-PEI Komplexe wurden entsprechend Beispiel 1 jeweils am Morgen vor der Injektion frisch hergestellt.

Für den Tierversuch wurden in insgesamt 15 Versuchstieren jeweils zwei 1205 Tumorzellenotransplantate in den Flanken der Tiere durch subkutane Injektion von 1×10^6 Tumorzellen induziert. Nachdem die Tumore nach drei Tagen zu einer sichtbaren und tastbaren Grösse von ca. 2x2 mm herangewachsen waren, wurden

5 die Tiere zufällig in eine Behandlungsgruppe und eine Kontrollgruppe eingeteilt. In der Behandlungsgruppe wurden 8 Tieren Ribozym/LMW-PEI Komplexe (N/P Verhältnis = 1:66,66; 8 µg Ribozym / Injektion) im Abstand von 2 Tagen i.p. injiziert. In der Kontrollgruppe wurden 7 Tieren die gleiche Menge LMW-PEI (72 µg pro Injektion) ohne Ribozym im gleichen Abstand i.p. injiziert. Nach insgesamt 7

10 Injektionen wurden drei Tage nach der letzten Injektion die Tiere getötet, die subkutanen Tumoren entnommen und das Tumolvolumen bestimmt. In der Kontrollgruppe (7 Tiere = 14 Tumore) ergab sich eine mittlere Tumorgrösse von $2061 \pm 481 \text{ mm}^3$ (Mittelwert und Standardabweichung), während in der Behandlungsgruppe (8 Tiere = 16 Tumore) eine mittlere Tumorgrösse von $1066 \pm$

15 195 mm^3 (Mittelwert und Standardabweichung) vorlag. Diese spezifische Ribozym-vermittelte Hemmung des 1205 Tumorennotransplantat-Wachstums um 48 % war im ungepaarten t-Test signifikant ($p < 0,05$).

Diese ausgeprägte Hemmung des 1205-Tumorstums um ca. 50 % nach 20

20 Tagen ist noch bemerkenswerter, wenn man sie im Kontext von Vergleichsuntersuchungen sieht. Wir haben in ähnlichen Tierversuchen mit chemisch stabilisierten RNS/DNS-Ribozym-Hybridmolekülen (werden als Goldstandard gesehen), die uns von der führenden Firma auf diesem Gebiet (Ribozyme Pharmaceuticals, Boulder, Colorado, USA) zur Verfügung gestellt wurden, lediglich

25 eine Abnahme des 1205-Tumorstums um ca. 20 % nachweisen können (unpublizierte Daten).

Es lässt sich also festhalten, dass diese Kombination aus LMW-PEI und nicht-modifizierten RNS-Ribozymen ein neues und außerordentlich effektives Agens zur

30 selektiven Reduktion der Expression von Genen in vivo in Tierversuchen ist.

Erläuterung der Abbildungen:

Fig. 1 FGF-BP RNA (800 Nucleotide) - Degradation in 20 ng/ml RNaseA (plus / minus LMW-Polyethylenimin (PEI) – Komplexierung):

- 5 Während bei der Inkubation mit RNase A (Endkonzentration 20 ng/ml) die nicht-komplexierte RNS erwartungsgemäß bereits nach 15 Minuten fast komplett abgebaut ist, sind von der PEI-komplexierten RNS auch nach 2 Stunden Inkubation noch mehr als 60 % der Moleküle intakt.

- 10 **Fig. 2** FGF-BP RNA (800 Nucleotide) - Degradation in 1 % FCS (plus / minus LMW-Polyethylenimin (PEI) – Komplexierung):

Eine sehr ähnliche Kinetik wie in Fig. 1 ergibt sich auch nach der Inkubation mit fötalem Kälberserum (Fig. 2). Hier ist die nicht-komplexierte RNS nach ca. 30 Minuten nach der Inkubation mit 1 % fötalem Kälberserum komplett abgebaut,

- 15 während die PEI-komplexierte RNS auch nach 120 Minuten noch vollständig intakt ist. Auch bei Erhöhung der Konzentration auf 40 % fötales Kälberserum ist die PEI-komplexierte RNS gegenüber der nicht-komplexierten RNS deutlich stabiler. Die Ergebnisse waren identisch für die verschieden langen RNS-Moleküle. Die Daten der Graphiken wurden aus zwei unabhängigen Experimenten gemittelt.

20

Fig. 3 FGF-BP Ribozyme komplexiert mit niedermolekularem PEI inhibieren FGF-BP mRNA Expression in ME-180 Plattenepithelkarzinomzellen nach transienter Transfektion.

- 25 **Fig. 4** FGF-BP Ribozyme komplexiert mit niedermolekularem PEI (N/P-Verhältnis 1:13) inhibieren FGF-BP mRNA Expression in ME-180 Plattenepithelkarzinomzellen nach transienter Transfektion.

- Fig. 5** FGF-BP Ribozyme komplexiert mit niedermolekularem PEI (N/P-Verhältnis 1:53) inhibieren FGF-BP mRNA Expression in ME- 180 Plattenepithelkarzinomzellen nach transienter Transfektion.
- 30

Wie aus den Fig. 3 - 5 hervorgeht, führte die Transfektion mit LMW-PEI-Ribozymen zu einer sehr starken Ribozym-spezifischen Abnahme der FGF-BP Genexpression.

Die maximale Reduktion betrug ca. 70 % verglichen mit den Kontrollzellen. Beide Ribozym-PEI-Verhältnisse von 1:13 und 1:53 zeigten ähnliche Effektivität.

Interessanterweise war die niedrigere Ribozym-Dosis von 0,1 µg in beiden PEI-Verhältnissen etwas wirksamer, so daß man davon ausgehen kann, dass auch noch
5 niedrigere Dosen bereits sehr effizient sein können.

Fig. 6 Pleiotrophin (PTN) Ribozyme komplexiert mit niedermolekularem PEI (N/P-Verhältnis 1:66,66) inhibieren das Wachstum von humanen Melanom-Tumorzelltransplantaten (1205 Zellen) in athymischen Nacktmäusen nach
10 systemischer Applikation.

1205 Tumorzellen (1×10^6 Zellen/Injektion) wurden in die Flanken von athymischen Nacktmäusen subkutan injiziert, und entweder mit PTN-Ribozymen komplexiert mit LMW-PEI (8µg Ribozym / Injektion) intraperitoneal (i.p.) im Abstand von zwei Tagen
15 injiziert (Behandlungsgruppe = 8 Tiere), oder nur mit LMW-PEI im gleichen Abstand behandelt (Kontrollgruppe = 7 Tiere). Nach 20 Tagen zeigte sich eine spezifische Ribozym-vermittelte Hemmung des Tumorwachstums um ca. 50 %.

Patentansprüche:

1. Verfahren zum Schutz von RNS gegen enzymatischen oder nicht-enzymatischen, intra- oder extrazellulären Abbau, dadurch gekennzeichnet, dass die RNS-Moleküle in einem Komplex mit Polyethylenimin (PEI), welches gegebenenfalls mit daran gekoppelten hydrophilen Polymeren modifiziert ist.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei welchem die RNS-Moleküle vor dem intra- oder extrazellulären Abbau durch Nukleasen geschützt werden.
3. Verfahren zur Einschleusung von RNS in Zellen, vorzugsweise in eukaryontische Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass ein Komplex der RNS mit PEI, welches gegebenenfalls mit daran gekoppelten hydrophilen Polymeren modifiziert ist, verwendet wird.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die RNS in aktiver Form intrazellulär aus dem Komplex freigesetzt werden und biologische Funktionen ausüben können.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, bei welchem die RNS eine messenger-RNS (mRNS), eine ribosomale RNS (rRNS), eine transfer-RNS (tRNS), eine Kern-RNS (nukleäre RNS), ein RNS-Ribozym, ein RNS-Aptamer, eine in vitro transkribierte RNS oder eine chemisch synthetisierte RNS ist, wobei alle genannten RNS-Moleküle chemisch modifiziert sein können.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, in welchem die RNS ganz oder zum Teil für ein therapeutisch wirksames Peptid oder Protein oder für ein zelluläres Selbstmordgen kodiert,
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die RNS 10 bis 10.000 Nukleotide, vorzugsweise 15 bis 1.500 Nukleotide, insbesondere 20 bis 1.000 Nukleotide aufweist.

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der RNS um ein Ribozym, vorzugsweise Hammerhead-Ribozym handelt.
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das PEI nicht mit daran gekoppelten hydrophilen Polymeren modifiziert ist.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das PEI mit einem oder mehreren daran gekoppelten hydrophilen Polymeren modifiziert ist.
11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das hydrophile Polymer mit einem oder mehreren daran gekoppelten PEI modifiziert ist.
12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, dass das hydrophile Polymer Polyethylenglykol (PEG) ist.
13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das PEI ein Molekulargewicht von 700 bis 1.000.000 Da, vorzugsweise 1.400 bis 25.000 Da, insbesondere 1.600 bis 15.000 Da aufweist.
14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, bei welchem das molare Verhältnis der Stickstoffatome im PEI zu den Phosphoraten in der RNS (N/P-Wert) 1 bis 100, vorzugsweise 2 bis 40, insbesondere 3 bis 10 beträgt.
15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, bei welchem das PEI durch einen zellulären Liganden modifiziert ist.
16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die RNS-Konzentration 0,01 – 1000 µg/ml, vorzugsweise 1 – 100 µg/ml, besonders bevorzugt 10 – 40 µg/ml beträgt.

17. Komplex aus einer einem Ribozym, vorzugsweise Hammerhead-Ribozym, und Polyethylenimin (PEI), welches gegebenenfalls mit daran gekoppelten hydrophilen Polymeren modifiziert ist.
18. Komplex gemäß Anspruch 17, in welchem das PEI nicht mit daran gekoppelten hydrophilen Polymeren modifiziert ist.
19. Komplex gemäß Anspruch 17, in welchem das PEI mit einem oder mehreren daran gekoppelten hydrophilen Polymeren modifiziert ist.
20. Komplex gemäß Anspruch 17, in welchem das hydrophile Polymer mit einem oder mehreren daran gekoppelten PEI modifiziert ist.
21. Komplex gemäß einem der Ansprüche 17, 19 und 20, in welchem das hydrophile Polymer Polyethylenglykol (PEG) ist.
22. Komplex gemäß einem der Ansprüche 17 bis 21, in welchem das PEI ein Molekulargewicht von 700 bis 1.000.000 Da, vorzugsweise 1.400 bis 25.000 Da, insbesondere 1.600 bis 15.000 Da aufweist.
23. Komplex gemäß einem der Ansprüche 17 bis 22, in welchem das molare Verhältnis der Stickstoffatome im PEI zu den Phosphoraten im Ribozym (N/P-Wert) 1 bis 100, vorzugsweise 2 bis 40, insbesondere 3 bis 10 beträgt.
24. Komplex gemäß einem der Ansprüche 17 bis 23, in welchem das PEI durch einen zellulären Liganden modifiziert ist.
25. Verfahren zur Herstellung eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 17 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass die RNS mit dem gegebenenfalls durch einen zellulären Liganden oder gegebenenfalls durch ein weiteres Polymer modifizierten PEI durch Mischen der verdünnten Lösungen komplexiert wird.

26. Verfahren gemäß Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Ribozym-Konzentration 0,01 – 1000 µg/ml, vorzugsweise 1 – 100 µg/ml, besonders bevorzugt 10 – 40 µg/ml beträgt.
27. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend eine wirksame Menge mindestens eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 17 bis 24 und einen oder mehrere physiologisch unbedenkliche Träger.
28. Zusammensetzung gemäß Anspruch 27, in welcher das Ribozym in jeder für Zellen oder für den jeweiligen Organismus subtoxischen oder zumindest bei mehrstündiger Behandlung noch nicht dauerhaft zellschädigender Konzentration vorliegt.
29. Verwendung einer Zusammensetzung gemäß Anspruch 27 oder 28 für die Gentherapie.
30. Verwendung einer Komplexes gemäß einem der Ansprüche 17 bis 24 zum Schutz von Ribozymen gegen enzymatischen oder nicht-enzymatischen Abbau bei der Lagerung oder beim Transport der Ribozyme modifiziert oder nicht modifiziert, in wässrigen Lösungen, oder bei der Verwendung von Ribozymen, modifiziert oder nicht modifiziert, in Laborexperimenten.

Fig. 1

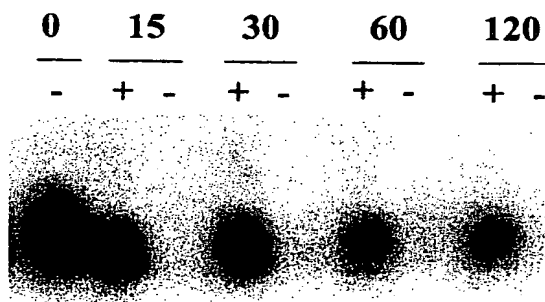
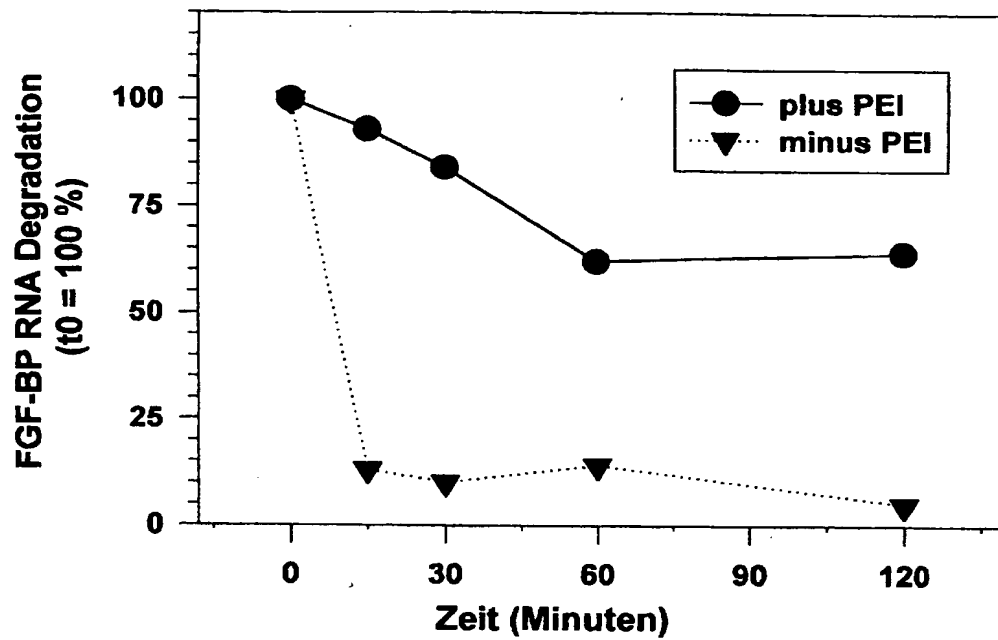


Fig. 2

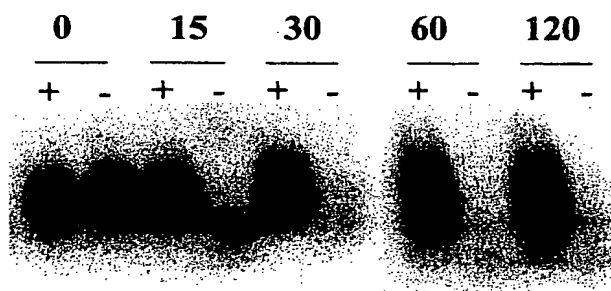
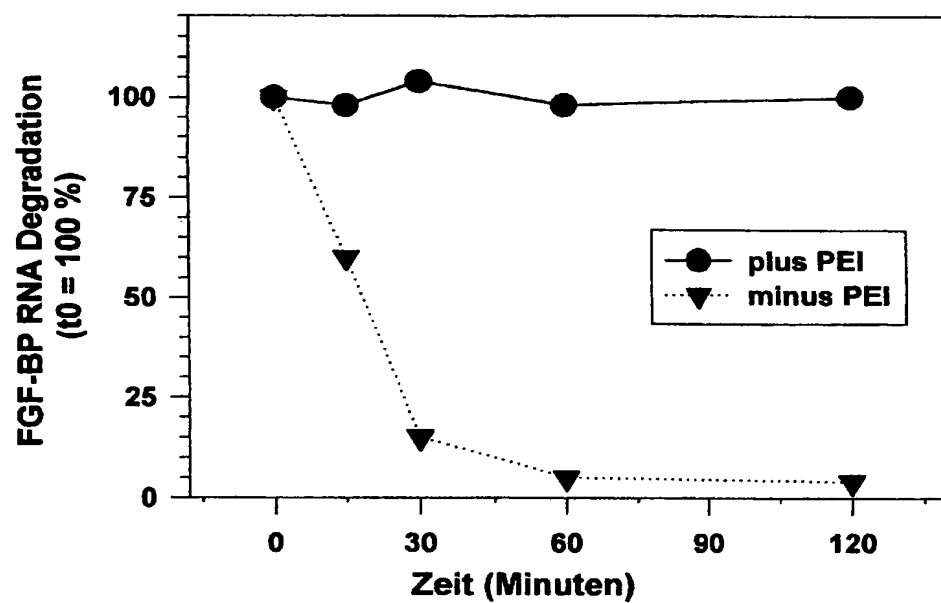


Fig. 3

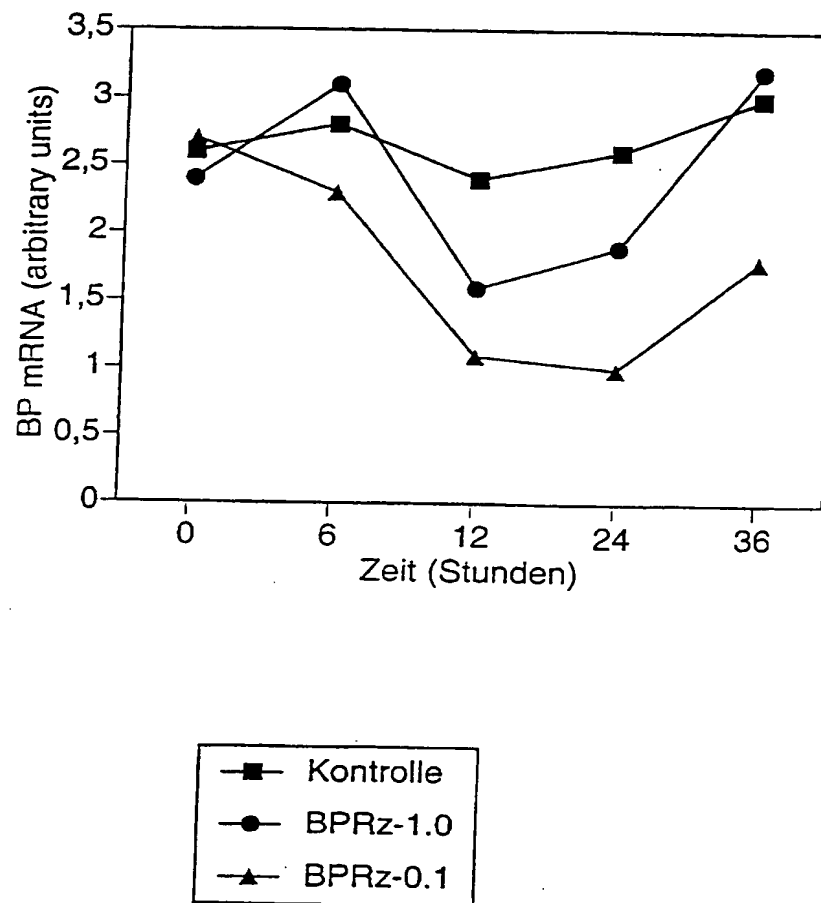


Fig. 4

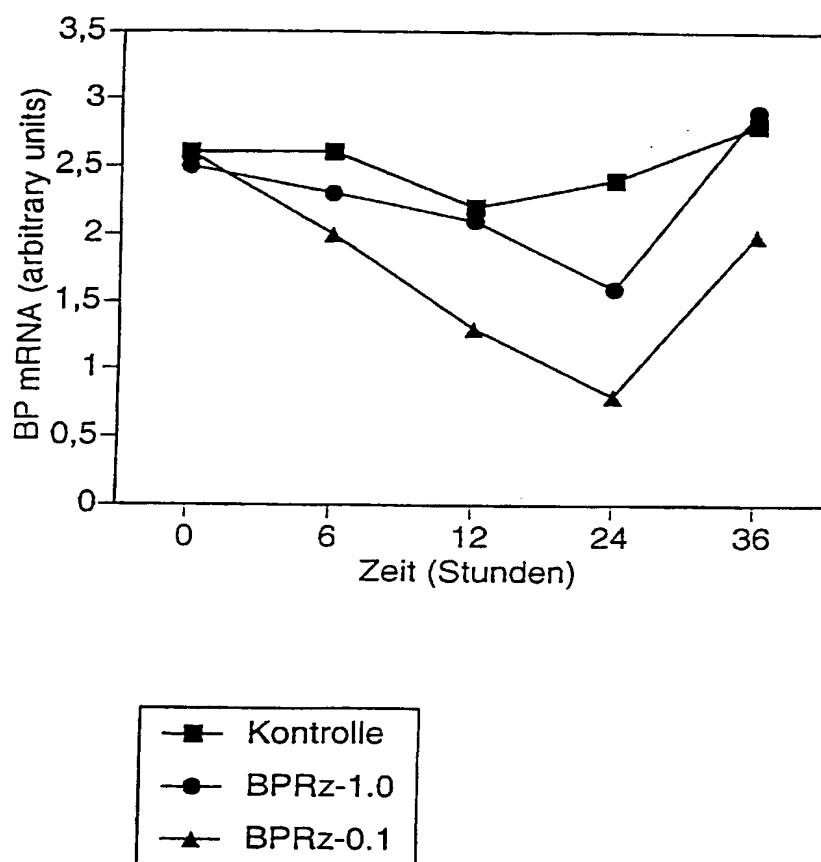


Fig. 5

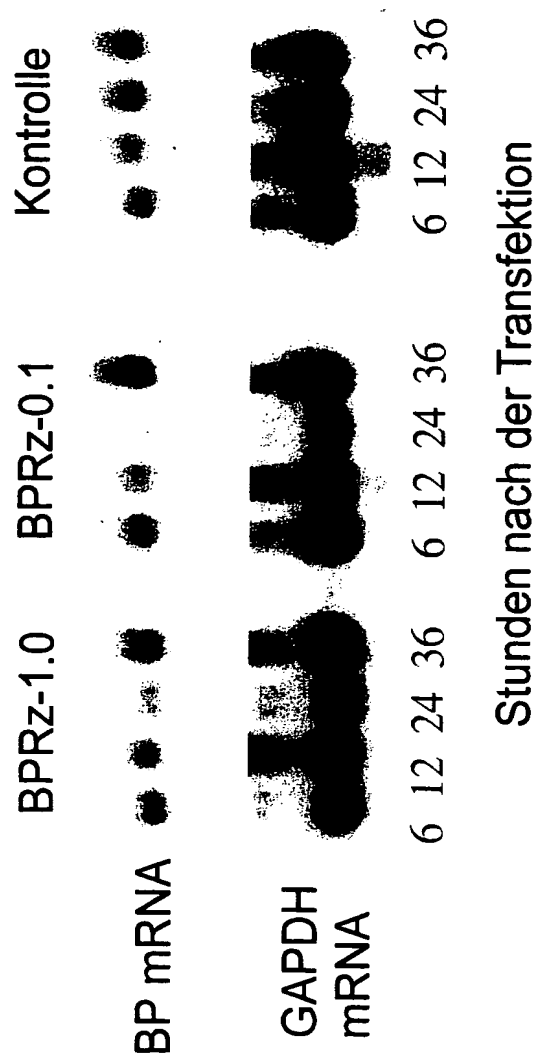
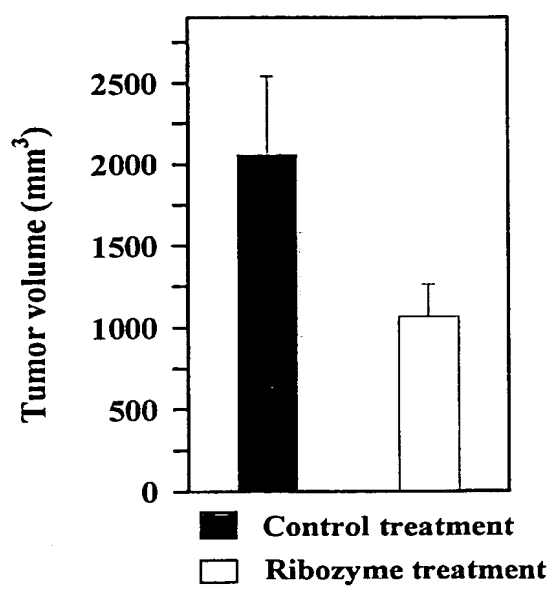


Fig. 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No
PCT/EP 00/12413

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 248 531 A (SOUTHERN RES INST) 9 December 1987 (1987-12-09) page 2, column 1, line 46 - line 49 ----	1-30
P, X	WO 00 59548 A (RES DEV FOUNDATION) 12 October 2000 (2000-10-12) page 5, line 3 - line 12; claim 16 -----	1-6, 16, 17, 27-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/12413

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9859064 A	30-12-1998	DE 19726186 A AU 8338598 A EP 1003897 A	24-12-1998 04-01-1999 31-05-2000
WO 9602655 A	01-02-1996	FR 2722506 A AU 2930795 A AU 4444199 A CA 2194797 A EP 0770140 A FI 970115 A JP 10502918 T NO 970049 A US 6013240 A ZA 9505849 A	19-01-1996 16-02-1996 14-10-1999 01-02-1996 02-05-1997 10-01-1997 17-03-1998 07-01-1997 11-01-2000 21-02-1996
WO 9905303 A	04-02-1999	AU 8428998 A US 6110745 A	16-02-1999 29-08-2000
EP 0248531 A	09-12-1987	NONE	
WO 0059548 A	12-10-2000	AU 4372600 A	23-10-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. es Aktenzeichen

PCT/EP 00/12413

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K47/48 C12N15/87 C12N9/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 98 59064 A (KIRCHEIS RALF ;OGRIS MANFRED (AT); BRUNNER SYLVIA (AT); WAGNER ERN) 30. Dezember 1998 (1998-12-30) in der Anmeldung erwähnt Anspruch 30 ---	1-30
X	WO 96 02655 A (MERGNY MOJGAN ;BEHR JEAN PAUL (FR); BOUSSIF OTMANE (FR); SCHERMAN) 1. Februar 1996 (1996-02-01) in der Anmeldung erwähnt Seite 9, Zeile 1,2; Ansprüche 1,21 ---	1-4,6, 9-12,25
Y	---	1-30
Y	WO 99 05303 A (INEX PHARMACEUTICALS CORP ;HOPE MICHAEL (CA); SCHERRER PETER (CA);) 4. Februar 1999 (1999-02-04) Anspruch 61 ---	1-30

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Mai 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25/05/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Deffner, C-A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/12413

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 248 531 A (SOUTHERN RES INST) 9. Dezember 1987 (1987-12-09) Seite 2, Spalte 1, Zeile 46 - Zeile 49 ----	1-30
P,X	WO 00 59548 A (RES DEV FOUNDATION) 12. Oktober 2000 (2000-10-12) Seite 5, Zeile 3 - Zeile 12; Anspruch 16 -----	1-6,16, 17,27-29

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internatio. Aktenzeichen

PCT/EP 00/12413

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9859064 A	30-12-1998	DE 19726186 A AU 8338598 A EP 1003897 A	24-12-1998 04-01-1999 31-05-2000
WO 9602655 A	01-02-1996	FR 2722506 A AU 2930795 A AU 4444199 A CA 2194797 A EP 0770140 A FI 970115 A JP 10502918 T NO 970049 A US 6013240 A ZA 9505849 A	19-01-1996 16-02-1996 14-10-1999 01-02-1996 02-05-1997 10-01-1997 17-03-1998 07-01-1997 11-01-2000 21-02-1996
WO 9905303 A	04-02-1999	AU 8428998 A US 6110745 A	16-02-1999 29-08-2000
EP 0248531 A	09-12-1987	KEINE	
WO 0059548 A	12-10-2000	AU 4372600 A	23-10-2000